

Aus dem Institut für gerichtliche Medizin  
und Kriminalistik  
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg  
Direktor: Prof. Dr. med. et phil. E. Weinig

---

Fluoreszenzmikroskopische  
Untersuchungen  
zum Nachweis von Grünalgen  
beim Ertrinkungstod

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Alexander-Universität  
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von

Hans Wolfram Greiling  
Medizinalassistent aus Nürnberg



Aus dem Institut für gerichtliche Medizin  
und Kriminalistik  
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg  
Direktor: Prof. Dr. med. et phil. E. Weinig

---

Fluoreszenzmikroskopische  
Untersuchungen  
zum Nachweis von Grünalgen  
beim Ertrinkungstod

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Alexander-Universität  
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von

Hans Wolfram Greiling  
Medizinalassistent aus Nürnberg



Referent: Professor Dr. Dr. Weinig

Dekan: Professor Dr. Windorfer

Tag der mündlichen Prüfung: 26. November 1962

# GLIEDERUNG

## A.) Allgemeiner Teil

- |                                                          |          |
|----------------------------------------------------------|----------|
| I. Einleitung                                            | Seite 4  |
| II. Übersicht über die wichtigsten Methoden              | Seite 6  |
| III. Anwendungsmöglichkeiten der Verfahren bei Grünalgen | Seite 10 |

## B.) Experimenteller Teil

- |                                          |          |
|------------------------------------------|----------|
| I. Methodik                              | Seite 11 |
| II. Vorversuche                          | Seite 15 |
| III. Hauptversuche                       | Seite 15 |
| IV. Versuch an Meerschweinchen           | Seite 18 |
| V. Beobachtungen an menschlichen Leichen | Seite 19 |

## C.) Diskussion der Beobachtungen

|          |
|----------|
| Seite 20 |
|----------|

|                 |          |
|-----------------|----------|
| Zusammenfassung | Seite 23 |
|-----------------|----------|

|           |          |
|-----------|----------|
| Literatur | Seite 25 |
|-----------|----------|

|            |          |
|------------|----------|
| Lebenslauf | Seite 29 |
|------------|----------|

## A.) Allgemeiner Teil

### I. Einleitung

In der Diagnostik des Ertrinkungstodes hat sich der Nachweis von korpuskulären Bestandteilen der Ertrinkungsflüssigkeit in den inneren Organen der Leiche zu einem der entscheidendsten Kriterien entwickelt. Die vorliegende Arbeit hat einen der spezifischen Organismen natürlicher Gewässer, die Grünalge, zum Gegenstand. Obwohl mengenmäßig vor allem im Sommer häufiger auftretend, hat sie in der Literatur in den letzten beiden Jahrzehnten nicht die Beachtung gefunden wie die Kieselalge, die Diatomee. Dies lag daran, daß die letztere durch ihr Kieselskelett gegen die angewandten Nachweis- und Aufschlußverfahren weitgehend unempfindlich und selbst nach Zerstörung des gesamten organischen Materials noch einwandfrei nachweisbar ist. Hier soll nun versucht werden, ein Untersuchungsverfahren zu beschreiben, das es ermöglicht, Grünalgen im histologischen Schnitt und im Blutaussstrich nachzuweisen.

Die Feststellung Incze's, daß Funde von Diatomeen auch einmal bei Nichtertrunkenen selbst in den Organen vorkommen können (durch Einatmen kieselgurhaltigen Staubes zum Beispiel), würde als Einschränkung der Diagnose „Ertrinken“ durch den Nachweis chlorophyllhaltiger Grünalgen entfallen. Außerdem wurde gleichzeitig die Frage berücksichtigt, aus dem Zeit-

raum, innerhalb dessen in einer Leiche noch Algen aufzufinden sind, auf die Dauer des Aufenthaltes jener im Ertrinkungsmedium zu schließen.

Der Nachweis von Fremdkörpern, die aus der Ertrinkungsflüssigkeit stammen, wurde schon zu Anfang dieses Jahrhunderts von Revensdorf, Corin und Stockis sowie Reinsberg u. a. geübt und beschrieben. Es handelte sich anfangs vorwiegend um Mineralbestandteile und bei russischen Autoren, die experimentell mit Tieren arbeiteten, um Lycopodiumsporen und Stärkekörner. Obwohl schon damals diese Bestandteile nicht nur in den Lungenalveolen und den zuführenden Luftwegen, sondern auch in großen Gefäßen und im Herzen nachgewiesen wurden, legte man später, als auch das Phyto- und Zooplankton in der Diagnostik mehr beachtet wurde, auf den letzteren Auffindungsort keinen Wert mehr, zumal Frenkel und Straßmann kristalline Partikel auch bei Sektionen Nichtertrunkener im linken Herzen fanden. Erst als 1941 Incze und Mitarbeiter sowie Mueller und Gorgs (1949) durch ausgedehnte Tierexperimente und Versuche mit menschlichen Leichen, ferner durch Auswertung eines großen Sektionsgutes einerseits nachwiesen, daß Diatomeen beim Ertrinken in die Gefäße des großen Kreislaufes eindringen, und andererseits die Möglichkeit postmortalen Einfließens von Flüssigkeit in die Luftwege und selbst die Alveolen einer im Wasser befindlichen Leiche bestätigten, stellte der Nachweis des Planktons nur noch in den Organen des großen Kreislaufes eine vitale Reaktion des Ertrinkens dar. Auch Busch (1950) sowie Weinig und Pfanz (1951) haben darüber berichtet.

Ein demonstrativer Versuch von Kovács und Nagy soll noch erwähnt werden, welche das Eindringen von Ertrinkungsflüssigkeit, in der sie  $\text{FeCl}_3$  gelöst hatten, durch die Berliner-Blau-Reaktion in allen Organen des Körperkreislaufes aufzeigten. Die Reaktion war negativ bei postmortal in die Lösung gebrachten Tieren und Neugeborenen. Vordringen der Flüssigkeit während der Aspiration bis in die linke Kammer beschrieb Paltauf schon 1888, wobei er das gleiche Prinzip anwandte.

## II. Übersicht über die wichtigsten Methoden

Zu den Methoden, Plankton in den Organen nachzuweisen, gehören die Veraschung, der Aufschluß durch Säuren, die Herstellung von Abstreifpräparaten, Preßsäften, histologischen Schnitten sowie die Untersuchung des Blutes und der Spülflüssigkeit des linken Herzens. Als besondere Verfahren sollen noch das Anlegen von Kulturen und die Lungenknochprobe angeführt werden.

Bei der Veraschung werden Teile von Organen in einer Platinschale, nachdem man vorher unter Umständen Preßsaft entnommen oder auf andere Weise die größte Wassermenge entfernt hat, mit kleiner Flamme verascht. Die bleibende farblose Asche wird vorsichtig in verdünnter Salzsäure gelöst und das Zentrifugat mikroskopisch untersucht.

Der Aufschluß geschieht mit den Teilen der wasserarmen Substanz in einer Verdampfungsschale mit rauchender Salpetersäure unter dem Abzug, anschließend mit konzentrierter Schwefelsäure im Kjeldahl-Kolben unter Erhitzen. Die schließ-

lich wasserklare Flüssigkeit wird ebenfalls zentrifugiert. Bei diesen beiden Verfahren besteht wegen der großen Organsubstanz, die zur Untersuchung herangezogen werden kann, die Möglichkeit, auch bei geringem Diatomeengehalt der Ertrinkungsflüssigkeit zu positiven Ergebnissen zu gelangen. Für den Nachweis irgendwelcher organischer Bestandteile muß man allerdings zu einer der folgenden Methoden greifen.

Technisch einfach ist die Bereitung eines Abstreifpräparates, das aber nur bei der Untersuchung der Lungen aussichtsreich ist. Dazu streift man mit dem Messer von der Schnittfläche der Lunge austretende Flüssigkeit ab und untersucht sie auf dem Objektträger, nachdem man gegebenenfalls die Erythrozyten mit einigen Tropfen destillierten Wassers hämolysiert hat. Dieses schon von Revensdorf angegebene Verfahren hat Kasperek als wenig ergiebig bezeichnet, und er gibt der Untersuchung des Lungenpreßsaffes den Vorzug. Hierbei wird ein Teil der Lunge durch Auspressen von seinem Wassergehalt befreit, dieser Preßsaft mehrmals zentrifugiert, verdünnt und durch besondere Zusätze (0,5 %ige Natriumkarbonatlösung) von den übrigen zellulären Bestandteilen gereinigt.

Diese beiden Methoden haben, da heute für die Frage des Ertrinkungstodes nur der Nachweis in den Organen des großen Kreislaufes beweisend ist, keine ausschlaggebende Bedeutung mehr, zumal auch die Möglichkeit der Verunreinigung nie ganz auszuschließen ist.

Das umständliche Kulturverfahren hat sich nicht eingebürgert, da es auch ohne wesentliche positive Ergebnisse bleibt, wie Kasperek feststellt. Die Lungenkochprobe (L ö b e r u. a.)

ist analog der Veraschung und dem Säureaufschluß mit dem Nachteil behaftet, nur die unzerstörbaren Kieselenskelette der Diatomeen sichtbar werden zu lassen.

Die Untersuchung des Blutes aus dem linken Ventrikel fußt bereits auf der Tatsache, daß Teilchen, die in dem Ertrinkungsmedium suspendiert sind, durch Risse der Alveolarwände in Kapillaren und Gefäße des kleinen Kreislaufes gelangen, durch sie in das linke Herz, dessen finale Kontraktionen sie mit dem Blut in alle Organe des großen Kreislaufes verteilen, wo sie dann eine weitere Nachweismöglichkeit geben.

Die Methode der Einbeziehung des linken Ventrikels in die Untersuchung haben wohl zuerst C o r i n und S t o c k i s angegeben (1909), die nach der Entnahme des geringen Blutrückstandes das Endokard der Kammer mit destilliertem Wasser mehrmals spülten und in beiden Flüssigkeiten Partikel aus dem Ertrinkungswasser feststellten. Hierbei wurden die roten Blutkörperchen hämolysiert und die anderen kristallinen Bestandteile durch Salzsäure, welche die Kalzium- und Silikatskelette schont, zerstört.

Modifiziert wurde dieses Verfahren in jüngster Zeit durch F. T h o m a s und Mitarbeiter. Sie schnitten das Endokard der linken Kammer und die Mitralklappe möglichst vollständig ab und mazerierten diese Teile mehrere Stunden in destilliertem Wasser. Das gewonnene Material wird nach dem Zentrifugieren untersucht. Es hat durchaus regelmäßig zum Auffinden von chlorophyllhaltigem Plankton, außerdem auch von Diatomeen, geführt.

Mit dem Verfahren des Nachweises im linken Herzen arbeiteten auch P a s c h u k a n i s s und W e r t o g r a d o w sowie

Ros a n o w bei ihren Untersuchungen auf Stärkekörner, die durch Aspiration von Erbrochenem vor dem Ertrinkungstod in den Kreislauf gelangten.

Schließlich wurde auch die Standardmethode der postmortalen Diagnostik, der histologische Schnitt, angewandt. Solange allerdings die Lunge im Vordergrund der Untersuchungen stand, maß man dieser Methode aus mehreren Gründen nur eine untergeordnete oder gar keine Bedeutung bei. K a s p a r e k, der sämtliche bis dahin bekannte Untersuchungsverfahren ausführlich geprüft hat, kommt zu dem Schluß, daß „die Schnittmethode für den Planktonnachweis in der Lunge vollkommen unbrauchbar ist“ und die Ergebnisse in keinem Verhältnis zur aufgewendeten Mühe ständen. Diese Ergebnisse waren gleich Null, zumal eventuell auftretende Fremdkörper auch bei dem Schnittverfahren ein- oder ausgeschwemmt werden können. Die Preßsaftuntersuchung dieser Lungen ergab jedesmal positive Resultate.

Als durch Versuche von I n c z e und Mitarbeitern, sowie M u e l l e r und G o r g s die Suche in den Organen des Körperkreislaufes, vor allem in Nieren, Muskulatur, Gehirn und Leber aussichtsreich erschien und diese Autoren durch Veraschung Aufschluß und Hämolyse des Herz- und Organblutes in einem überwiegenden Prozentsatz der Fälle Diatomeen fanden, kam die Methode des histologischen Schnittes wieder zur Anwendung. W e i n i g und P f a n z entwickelten ein Verfahren, das es ermöglichte, die charakteristischen Formen der Kieselalge im Organschnitt nachzuweisen. Sie griffen auf die T i m m'sche Methode des „Optisch leeren Schnittes“ zurück, dessen Einbettungsart in Monobrombenzol und Kanadabalsam die Diato-

meen im Dunkelfeld als leuchtende Gebilde sichtbar werden läßt. Hiermit gelang es ihnen, im Experiment das Auftreten von Algen in der Niere, im Zwerchfell, in der Herz- und Extremitätenmuskulatur, in der Schilddrüse und im Großhirn nachzuweisen.

### III. Anwendungsmöglichkeiten der Verfahren bei Grünalgen

Von diesen aufgeführten Verfahren eignen sich zum Konservieren von chlorophyllhaltigen Algen nur das Abstreifpräparat, der Preßsaft und die Untersuchung des Inhaltes der linken Herzkammer, schließlich unter bestimmten Umständen der histologische Schnitt. Bei den ersten Methoden ist die Gefahr der Verunreinigung durch chlorophyllhaltiges Material, das sich zu meist in großen Mengen auf der Körperoberfläche und an den Kleidern der Leiche findet, praktisch nicht völlig auszuschließen, weiterhin eignen sich Abstreifen und Auspressen nur für die flüssigkeitsreiche Lunge. Wegen deren Nähe und der Möglichkeit des Eindringens der Lungenflüssigkeit bei der Sektion ist auch die Verwertung des Inhaltes der Herzkammer nur mit Vorsicht möglich. Die Gelegenheit, die Algen an den im Augenblick des Todes erreichten Ort fixiert aufzufinden, hat man letztlich nur im Schnitt. Um dieses Ziel zu erreichen, müssen allerdings eine ganze Reihe von Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden, die im einzelnen noch zu besprechen sind. Über Rückschlüsse von Grünalgenfunden auf die Liegedauer der Leiche und die Einflüsse der Fäulnis hat bisher nur K a s p a r e k 1937 Untersuchungen vorgenommen. Er injizierte in den Bronchus eines Lungenlappens, der von einem an anderer Ursache Verstorbenen stammte,

planktonangereichertes Wasser. Diesen Lungenlappen setzte er nun der Fäulnis aus und entnahm im Abstand von acht Tagen über mehrere Monate hin Teile des subpleuralen Gewebes und untersuchte den Preßsaft. Er kam dabei zu folgendem Ergebnis: Die Grünalgen werden mit fortschreitender Fäulnis zunehmend verändert, und zwar teils im Sinne einer Abblassung und eines Verlustes von Chlorophyll, teils durch Schrumpfung und Ablösen aus ihrem Zellverband, sodaß eine Unterscheidung vom übrigen Zelldetritus weitgehend unmöglich wird. Die völlig unveränderten Grünalgen nehmen immer mehr ab, sind aber nach acht Wochen, wenn auch sehr selten, noch nachweisbar. Zur zeitlichen Abhängigkeit stellte er fest, daß in den ersten zwei Wochen die Zahl der unveränderten Grünalgen nur wenig abnimmt, daß sie aber nach acht Wochen nur noch unter größten Schwierigkeiten zu finden sind.

## B.) Experimenteller Teil

### I. Methodik

Unter den für Grünalgen geeigneten Nachweisverfahren ist der histologische Schnitt für Organe wie Nieren, Leber und Herz wohl als das beste anzusehen. Demzufolge haben wir uns der Auswertung dieser Methode auf chlorophyllhaltige Planktonorganismen hin zugewandt.

Die von manchen Untersuchern geäußerte Möglichkeit des Ausschwemmens der Algen durch die Vorgänge des Fixierens und Schneidens ist bei vorsichtiger Handhabung der Gefrierschnittmethode zwar nicht ausgeschlossen, aber doch weitgehend

eingeschränkt. Aus dem fixierten Organstück erfolgt wohl kein nennenswerter Verlust von Algenmaterial, und der Gefahrenpunkt, nämlich das Übertragen des frisch geschnittenen Präparates auf den Objektträger, das Aufziehen, muß schnell und sorgfältig erfolgen, wobei eine etwas größere Schnittdicke (20-40  $\mu$ ) sich günstig auswirkt.

Vor der genauen Beschreibung der durchgeführten Experimente seien noch einige theoretische Bemerkungen eingefügt. Obwohl In c z e bei seinen Untersuchungen feststellen konnte, daß vereinzelt Diatomeen bis zu einer Länge von 120  $\mu$  in den Kreislauf übertreten und Größen von 40  $\mu$  bis 60  $\mu$  durchaus öfter anzutreffen sind, haben wir zur Erzielung besserer Resultate eine Grünalgensorte gewählt, die für diesen Zweck möglichst optimale Eigenschaften aufweist, nämlich die Gattung *Chlorella*<sup>1)</sup>. Die verwendete Art ist wahrscheinlich *Chlorella* cf. *ellipsoidea*. Sie kommt einzellig vor, ihre Form ist oval und weist die nur in ganz geringen Grenzen schwankende Durchschnittslänge von 10  $\mu$  bis 15  $\mu$  auf. Somit ist sie einem Erythrozyten ähnlich und wird in größeren Mengen durch die eingerissenen Alveolarwände in die Gefäße übergehen können. Da durch die Verteilung im Körper eine Konzentrationsminderung der Algen eintritt, wurde im Ertrinkungsmedium, das bis auf geringe Verunreinigungen ausschließlich diese Art enthielt, eine möglichst große Algendichte angestrebt.

Als zweiter Punkt war zu berücksichtigen, daß bei den histologischen Arbeitsgängen alles vermieden werden mußte, was zur

<sup>1)</sup> Für die freundliche Unterstützung bei Auswahl und Bestimmung der Grünalgen sei Herrn Dr. H. Glenk, Botan. Institut der Universität Erlangen (Dir. Prof. Dr. J. Schwemmler) an dieser Stelle bestens gedankt.

Beeinträchtigung des chlorophyllhaltigen Chromatophoren führen könnte. Es darf also, wie das ja auch schon von früheren Untersuchern festgestellt wurde, kein Verfahren angewandt werden, in dem zu irgendeiner Phase Alkohol benötigt wird (Fixierung in Alkohol, Paraffin- und Celloidineinbettung, die meisten Färbeverfahren).

Da eine Färbung nicht in Frage kam, die Methode des „Optischen leeren Schnittes“ ebenfalls nicht anwendbar ist, und Grünalgen nicht wie Kieselalgen im Polarisationsmikroskop sichtbar sind, ergab sich die Frage der Markierung dieser Grünalgen in einem mikroskopischen Bild, dessen morphologische Vielfalt, vor allem in der Niere, die sichere Erkennung erheblich erschwert. Als ein Untersuchungsverfahren für ungefärbte Schnitte kam hier die Fluoreszenzmikroskopie in Betracht. Hierbei kommt der günstige Umstand zustatten, daß Chlorophyll eine ganz charakteristische tiefrote Primär- oder Spontanfluoreszenz aufweist, d. h., eine Fluoreszenz, die bei Bestrahlung irgendeines chlorophyllhaltigen Körpers mit ultraviolettem Licht entsteht. Es handelt sich also um eine natürliche, spezifische Eigenfärbung von Chlorophyll enthaltenden Zellen. Die rote Fluoreszenz lebender Diatomeen beobachtete *Lehmann* im Jahre 1913, nachdem schon in der zweiten Hälfte des vorigen Jahrhunderts die Chlorophyllfluoreszenz als eine der ersten überhaupt entdeckt und beschrieben wurde.

Die Fluoreszenzmikroskopie wird zur Untersuchung menschlicher und tierischer Gewebe schon seit langem herangezogen (*Hicks und Matthaei u. a.*), wobei sowohl die Fähigkeit mancher Gewebsbestandteile, primäre Fluoreszenz auszusen-

den, als auch die Möglichkeit, mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen, sogenannten Fluorochromen, sekundäre Fluoreszenz zu erzeugen, ausgenutzt wurde. Systematische Untersucher wie Hamperl 1934 und Sjöstrand 1945/46 haben dabei in Bezug auf die primäre Fluoreszenz, die hier ausschließlich in Frage kommt, rote Spontanfluoreszenz nur für Porphyrin beschrieben, das aber lediglich in Oberhautschichten und Zähnen, sowie in speziellen Drüsen der Maus vorkommt (Derrien und Turchini). Die sogenannten Fluoreszyten sind protoporphyrinhaltige Erythrozyten. Sie sind im Fluoreszenzmikroskop nur wenige Minuten lang sichtbar, kommen beim Menschen in weniger als 1 Promille der Fälle vor, bei Ratten und Kaninchen gar nicht; Protoporphyrin ist sehr UV=instabil. Pathologisch tritt es allerdings in fast allen Organen bei der Porphyrie auf (Borst und Königsdörfer). Da es außerdem ja vom Ultraviolettlicht zerstört wird, kommt es für eine Verwechslung im Rahmen unserer Untersuchungen nicht in Betracht. „Andererseits kennen wir aber im menschlichen Organismus außer dem von außen zugeführten Chlorophyll keine rot fluoreszierenden Stoffe“ (Hamperl). Eine nach längerem Liegen auftretende diffuse rötliche Fluoreszenz in den Randpartien der Organe ist auf die Einwirkung von Fäulnisbakterien zurückzuführen (Fahr). So erschien es also aussichtsreich, mit diesem Verfahren einen Algennachweis im Gewebe zu versuchen.

Die Fluoreszenzeinrichtung blieb bei allen Versuchen unverändert in der Form, die sich für diese Untersuchungen als die optimale herausstellte: Große Fluoreszenz-Einrichtung der Firmen Zeiß und Winkler, Erregerfilter im Strahlengang der

UV-Lampe: BG 12 (Dicke 3 mm); Sperrfilterkombination: Sperrfilter OG 4 und OG 5, beide für Blau. Es wird hierbei die für die Erregung der roten Chlorophyll-Fluoreszenz am besten geeignete Blaulicht-Erregung benützt, sodaß außerdem eine Zerstörung der Chromoplasten durch kurzwelliges UV-Licht vermieden wird.

Weiterhin wurde das zur Anwendung gelangende Einschlußmittel der Firma Zeiß,  $n_D = 1,515$ , auf Eigenfluoreszenz sowie Beeinflussung der Algenfluoreszenz geprüft und als völlig neutral befunden.

## II. Vorversuche

Die Grünalgen zeigten unter dem Fluoreszenzmikroskop nach Fixierung mit Formalin (10 und 40%ig) keine Änderung ihrer starken, tiefroten Eigenfluoreszenz. Auch Austrocknung eines Ausstriches ohne Formalin konnte die rote Fluoreszenz nicht völlig zum Verschwinden bringen, obwohl das Präparat darüber hinaus mehrere Wochen sowohl im Hellen als auch im Dunkeln aufbewahrt wurde.

## III. Hauptversuche

Sechs weiße Mäuse wurden in der Suspension von Grünalgen ertränkt. Drei wurden sofort anschließend, die anderen drei nach 1-2 Tagen Liegezeit (in der Ertrinkungsflüssigkeit) seziiert. Hierbei wurde durch sorgfältiges Abspülen des Tierkörpers und mehrmaliges Wechseln der Instrumente versucht, Verunreinigungen von außen hintanzuhalten. Die Fixierung der entnommenen Organe (Nieren und Lungen) wurden in 10%igem

Formalin für mindestens 24 Stunden vorgenommen. Die Verwendung unfixierter Gewebeproben erlaubt auch eine „Schnellschnittuntersuchung“ während der Sektion. Anschließend wurden Gefrierschnitte mit oben erwähntem Mittel eingeschlossen. Diese Behandlung erfuhren sämtliche Schnitte.

Die Untersuchung der Lungenschnitte ergab: Zahlreiche rot fluoreszierende Partikel von der Größe und Anordnung der verwendeten Grünalgen in den Alveolen und deren Wänden sowie im Interstitium, keine in den Gefäßlumina, darüberhinaus verschieden nuancierte Gelbfluoreszenz der Gewebekomponenten. Zwischen den Lungen der sofort seziierten Tiere und denen derjenigen, die mindestens 24 h in der Flüssigkeit lagen, bestand kein ersichtlicher Unterschied. Kontrolltiere, die in Aqua dest. ertränkt wurden, zeigten lediglich die gelbe Gewebsfluoreszenz in den Lungen.

Die Nieren zeigten außer einem vielfältigen Spektrum von diffuser und umschriebener Gewebsfluoreszenz, das sich von Weißgelb bis zu Braun erstreckte, keinerlei Rotfluoreszenz. Umschriebene Körperchen, die allerdings gelb fluoreszierten, traten in ganz geringer Anzahl auf, sie waren stark granuliert (pigmentiert?) und wiesen gegenüber dem umliegenden Gewebe auffallende Lichtbrechungen auf. Sie hatten wohl die Größe der verwendeten Algen bzw. von deren „Bruchstücken“, kamen aber in ähnlicher Form auch in den Nieren der Kontrolltiere vor. Weiter darf hier noch einmal die Bedeutung der Wahl der richtigen Sperrfilterkombination hervorgehoben werden, da die Verwendung nur eines Sperrfilters für Blau, OG 5, eine Verschiebung der gesamten gelben und braunen

Gewebsfluoreszenz zu Rot und Orange zur Folge hatte, bedingt wahrscheinlich durch Beimengung des nicht völlig „weggefilterten“ blauen Erregerlichtes.

Als Beweis für die Identität der gefundenen Partikel, die meist in Gefäßen auftraten, mit den Algen darf also nur Rotfluoreszenz angesehen werden, die bei der oben angeführten Filterkombination deutlich sichtbar ist. Übereinstimmung mit den Algen allein in Form, Größe und Anordnung bzw. Lage, sowie im starken Lichtbrechungsvermögen, das auch die auf dem Ausstrich getrockneten und geschrumpften Algen aufwiesen, kann somit nur als Hinweis dienen und das auch nur dann, wenn in nachweisbar algenfreiem Gewebe keine derartigen Objekte erscheinen.

Folgerung: Da trotz der hohen Algenkonzentration in der Lunge keine fluoreszierenden Algen in der Niere gefunden wurden, besteht die Möglichkeit, daß die Fluoreszenzfähigkeit des Chlorophylls oder dieses selbst nach dem Übertritt in das Blut oder im Nierengewebe beeinträchtigt wird. Dies ist nach der beiläufigen Berechnung von In c z e und Mitarbeitern, wonach auf eine Niere ca. 1200 Diatomeen kommen und bei Berücksichtigung der von allen Organen am höchsten liegenden Durchblutungsgeschwindigkeit der Nieren wohl richtig gefolgert. Der Umstand, daß Formalinfixierung in Gewebsschnitten eine besondere Fluoreszenz bedingt (Stockinger, zit. nach Hamperl, sowie Neves und Castro), kann hier nicht als Ursache herangezogen werden, da erstens das auf gleiche Weise behandelte Lungengewebe die Rotfluoreszenz unbeeinflusst läßt und zweitens die, außerdem diffuse, Sekundärfluoreszenz

bei Formol nach Untersuchung der obengenannten Autoren ihr Maximum bei  $578\text{ }\mu$  hat, also im gelben Teil des Spektrums.

#### IV. Versuch an Meerschweinchen

Um diese Differenz zu klären, wurde als nächstes ein Meerschweinchen in einer noch höheren Algenkonzentration ertränkt. Einmal sollte damit der Faktor der Konzentrationsminderung bei der Verteilung im Körper weiter verringert werden, zum anderen war bei den etwas übersichtlicheren anatomischen Verhältnissen des Meerschweinchens eine Punktion des linken Ventrikels möglich zur Untersuchung der Frage, ob schon das Blut oder erst das Nierengewebe die Fluoreszenz löscht.

Ergebnis: Die Lunge wies ebenfalls das Bild massenhaft auftretender rotleuchtender Algen, die zum Teil noch in den ursprünglichen, lockeren kolonieartigen Verbänden angeordnet waren, die sie bei dichterem Auftreten im Wasser einnehmen.

Die Blutausrüche boten nirgends diese Fluoreszenz; sie zeigten aber vereinzelt ganz matt schmutzig-braunrot fluoreszierende Gebilde, die einen erythrozytenfreien Hof um sich bildeten und als Zusammenlagerung mehrerer Zellen von Algengröße imponierten, deren einzelne Form allerdings nicht mehr von der Regelmäßigkeit war wie die der ursprünglichen Zellen.

In der Niere waren nach längerem Suchen ganz vereinzelt solche Gebilde zu finden, zumeist an den Wänden interstitieller Gefäße. Ihre schon oben beschriebene eigenartige Fluoreszenz ließ sie zwar identifizieren, machte aber ihre Auffindung im Nierengewebe mit seinen mannigfachen Fluoreszenzen ähnlichen Farbcharakteren und meist vielfacher Intensität jedoch in der Praxis unmöglich.

Folgerung: Daraus läßt sich nun der Schluß ziehen, daß der Faktor, der die Fluoreszenz verhindert bzw. verändert oder das zugrunde liegende Chlorophyll zerstört, bereits im Blut auftreten muß, er kann andererseits in der Lunge nur in einer unwirksamen Konzentration oder gar nicht vorhanden sein. Unabhängig von der Frage des verändernden Faktors scheint es schon jetzt unmöglich, fluoreszenzmikroskopisch Grünalgen in den Organen mit Ausnahme der Lunge in der Praxis nachzuweisen, da diese Algenkonzentration im Ertrinkungsmedium nur in seltenen Ausnahmefällen vorkommen dürfte, somit also die Möglichkeit, eine Algenzelle im Gewebe zu finden, auch entsprechend unwahrscheinlicher wird.

#### V. Beobachtung an menschlichen Leichen

Um auszuschließen, daß eine rein physikalische Fluoreszenzlösung durch den Eisengehalt des Serums vorliegt, wurde algenhaltiges Wasser mit menschlichem Blut gemischt, welches mehrere Tage bei Kühlschranktemperatur aufbewahrt worden war. Die Fluoreszenz der Algen wurde hierbei aber nur ganz unwesentlich abgeschwächt.

In diesen Zusammenhang gehört auch die Feststellung von Gyöngyösi (zit. nach Incze), daß Algen ihre Beweglichkeit in mit destilliertem Wasser hämolysiertem Blut noch tagelang beibehalten, ihre organische Struktur sogar noch mehrere Wochen lang. Schließlich wurden auch Lunge und Niere von drei menschlichen Ertrinkungsleichen untersucht. Auch bei diesen war es nicht mit Sicherheit möglich, Algen in den Schnittpräparaten auffindig zu machen, auch nicht in der Lunge. Ein Ergebnis, welches sich mit der Angabe früherer Autoren deckt, die in den

Lungenschnitten Ertrunkener selten auf Plankton gestoßen waren. Die Liegedauer im Wasser variierte von einigen Minuten bis zu mehreren Wochen, die Ertrinkungsorte waren kleinere Flüsse in der Umgebung, in einem Fall die Küste des Mittelmeeres. Bei letzterem fanden sich allerdings in den Alveolen einige Diatomeen bzw. deren Bruchstücke, die aber keine Rotfluoreszenz zeigten.

### C.) Diskussion der Beobachtung

Bei Ertränkungsversuchen mit Mäusen und Meerschweinchen in einem grünalgenhaltigen Medium und anschließender Untersuchung der Organe mittels Fluoreszenzmikroskopie auf ihren Grünalgengehalt ergab sich folgendes:

- 1.) In den Lungen sind die Algen einwandfrei und auch nach tage- und wochenlanger Fäulnis in großer Zahl nachweisbar.
- 2.) Im Blut des linken Ventrikels und in der Niere des Meerschweinchens sind sie sehr schwer, in der Niere der Maus gar nicht nachzuweisen gewesen.
- 3.) Bei den drei menschlichen Ertrinkungsleichen war in keinem Fall der Grünalgenachweis in der Lunge oder Niere möglich.

Zur Frage, wie die Veränderung des Chlorophylls und seiner Fluoreszenz im Gewebe vor sich gehen kann, können die bislang bekannten Ergebnisse über den Chlorophyllabbau unter bestimmten Bedingungen herangezogen werden.

Einmal käme für den Abbau die Chlorophyllase in Betracht, eine Esterase, die in den meisten Chloroplasten enthalten ist.

Sie hat ihr  $p_H$ -Optimum bei 5,9, ihr Temperaturoptimum bei  $20^{\circ}C$ , ist aber sehr thermostabil. Sie spaltet in wasserhaltiger Lösung durch Hydrolyse das Phytol ab, wobei aus den Chlorophyllarten die alkoholfreien Chlorophyllide entstehen. Ihrer Tätigkeit käme also die Verschiebung der Wasserstoffionenkonzentration (nach der sauren Seite) in der Leiche entgegen.

Eine weitere Möglichkeit der Erklärung des Abbaus des Chlorophylls geben die Vorgänge bei der menschlichen Verdauung der Chlorophyll-Eiweiß-Verbindung, des Chloroplastins. Im Chloroplastin ist Chlorophyll noch fluoreszenzfähig angelagert. Nach Baumgärtel soll der saure Magensaft aus dem Chlorophyll das Magnesium abspalten, Lipase des Dünndarms aus dem entstehenden Phäophytin das Methanol und Phytol, wobei die Phorbide entstehen. Bakterielle Hydrierung im Dickdarm führt nach Abspaltung der Carboxylgruppe zu dem farblosen Phylloerythrinogen, dessen Struktur noch nicht aufgeklärt ist. Nach anderer Auffassung kann aus den Phorbiden, ebenso wie aus dem Chlorophyll selbst und dem Chlorophyllid, durch katalytische Reduktion Phäoporphyrin entstehen. Das Chlorophyll hat durch seinen komplizierten Aufbau verschiedene Angriffspunkte für den Abbau (Vinylgruppe, isocyclischer Ring, partiell hydrierter Kern IV, bei Chlorophyll b zusätzlich die Formylgruppe), sodaß daraus auch verschiedene Derivate resultieren. Obwohl neben dem sauren Milieu des Leichengewebes auch das Vorhandensein von Lipasen im Gewebe einen Abbau nach Art der Verdauung möglich machen würde, läßt doch die Tatsache, daß sowohl Phäophytin als auch Phorbid a noch rot fluoreszieren (allerdings in Lösung), dieses wieder weniger wahrscheinlich werden, oder man müßte einen raschen weiteren

Abbau zu nicht mehr fluoreszierenden Bruchstücken annehmen. Diese Frage jedoch liegt außerhalb des Rahmens dieser Arbeit. Schließlich kann die Fluoreszenzänderung der Algen auch durch ein Überwiegen des Chlorophylls b zustande gekommen sein, dessen Fluoreszenzfarbe im Gegensatz zur tiefroten des Chlorophylls a als braunstichig rot beschrieben wird. Einleuchtend erscheint überdies die Möglichkeit, daß das Magnesiumatom durch Serumeisen oder -kupfer ausgetauscht wird, wodurch, ähnlich wie beim Hämoglobin, welches auch nur ohne Eisen fluoresziert, die Chlorophyll-Fluoreszenz gelöscht und der Farbcharakter geändert wird. Daß ein solcher Austausch leicht möglich ist, zeigt das Konservieren des Spinates, wobei Kupfer das Magnesiumatom im Chlorophyllmolekül ablöst. Dies Molekül zeigt keine Spontanfluoreszenz mehr.

Der Nachweis chlorophyllhaltiger Zellen im Körper, vor allem also der im Wasser vorkommenden Grünalgen wäre grundsätzlich durch Fluoreszenz möglich. Grenzen werden ihm nur gezogen einmal von der Tatsache, daß die Konzentration der Algen zeitlich und örtlich in so großen Grenzen schwankt, daß nur geeignete Fälle, Ertrinken in grünalgenreichen Gewässern, erfolgversprechend sind, zum anderen dadurch, daß der Körper alsbald auf eine noch ungeklärte Art und Weise die starke Eigenfluoreszenz des Chlorophylls, zumindest nach dem Tod, im Blut und in den Organen des großen Kreislaufes weitgehend verhindert. Daß dies in den Lungen der Versuchstiere nicht zutraf, ist vermutlich damit zu erklären, daß die große Menge des eingedrungenen Wassers den fluoreszenzlöschenden Faktor im Körper bis zur Unwirksamkeit verdünnt hat, daß also die Milieuänderung für die Algen hier bei weitem nicht so groß ist wie beim Übertreten in das Blut.

## Zusammenfassung

1. Wegen des Vorkommens von Grünalgen in den einheimischen Gewässern und der Schwierigkeit ihres Nachweises mit dem Lichtmikroskop beim Ertrinkungstod wurde der Frage nachgegangen, ob auf Grund der spontanen Fluoreszenz des Algenchlorophylls ein fluoreszenzmikroskopischer Nachweis im Leichnam aussichtsreich erscheint.
2. Nach Erörterung früherer Ergebnisse bei der Diagnostik des Ertrinkungstodes durch Fremdkörpernachweis im Blut und in den Organen wird ein Überblick über die wichtigsten einschlägigen Methoden gegeben.
3. Bei den eigenen Versuchen wurde als Studienobjekt wegen ihrer günstigen Größe eine Algenart aus der Gattung *Chlorella* verwendet, die laufend in Reinkultur weiter gezüchtet wurde.
4. Bei Vorversuchen wurde die Fluoreszenz dieser Algen unter verschiedenen Bedingungen studiert, insbesondere ihr Verhalten im Blut und bei längerer Lagerung von Ausstrichen, auch im Dunkeln, zum Teil unter Fixierung in Formalin, wobei sich keine Änderung der Fluoreszenz ergab.
5. Die Hauptversuche wurden an Mäusen und Meerschweinchen vorgenommen. Nach Ertränken in grünalgenhaltigem Wasser wurden die Tiere zum Teil sofort, zum Teil nach

längerer Verweildauer (Tage bis Wochen) im Ertrinkungsmedium untersucht. Es wurde dabei so vorgegangen, daß von Lungen, Herz und Nieren nach mindestens 24-stündiger Fixierung in 10 %igem Formalin Gefrierschnitte angefertigt und in einem wasserlöslichen Einschlusmittel (Firma Zeiß,  $n_D = 1,515$ ) untersucht wurden. Hierfür wurde die große Fluoreszenzeinrichtung der Firmen Zeiß und Winkler verwendet. Zur Erregung der Chlorophyllfluoreszenz wurde Blaulicht (Erregerfilter BG 12) benützt.

6. Es zeigte sich, daß mit der angewandten Methode der Grünalgenachweis lediglich in den Lungen der Versuchstiere sicher gelang, in den Organen des großen Kreislaufes jedoch trotz hoher Algenkonzentration im Ertrinkungsmedium praktisch unmöglich war. Bei den Untersuchungen von drei menschlichen Ertrinkungsleichen aus algenhaltigen Gewässern waren weder in der Lunge noch in der Niere Grünalgen nachweisbar.
7. Es wurden die Gründe dafür erörtert, weshalb sich die Grünalge bzw. das Chlorophyll dem Nachweis in den genannten Organen entzieht.

## Literatur

1. B a n d o w, F.: Lumineszenz. Stuttgart 1950
2. B ö h m e r, K.: Tod durch Ertrinken, in: Handwörterbuch der gerichtlichen Medizin und naturwissenschaftlichen Kriminalistik. Jul.-Springer-Verlag 1940, S. 132-142
3. B o r s t und K ö n i g s d ö r f f e r: Untersuchungen über Porphyrie. Leipzig, S. Hirzel 1929
4. B u s c h, H.: Das Verhalten der Diatomeen im großen Kreislauf und ihr mikroskopischer Nachweis. Diss. Erlangen 1950
5. C h y t r e k, E.: Klin. Wchr. 19: 1321-1324 (1940)
6. C o r i n und S t o c k i s: Le diagnostic médico-légal de l'asphyxie par submersion. Bull. Acad. roy. Méd. Belg., Jan. 1909
7. D e r r i e n und T u r c h i n i: Neue Untersuchungen über die rote Fluoreszenz bei Tieren. C rend Soc. biol. 92:1030 (1925)
8. F a h r, E.: Frankf. Zschr. Path. 57:533-543 (1943)
9. F l a s c h e n t r ä g e r = L e h n a r t z: Physiologische Chemie, Springer, Göttingen-Berlin-Heidelberg, 1951
10. G o t z e s, G.: Über den Nachweis der suspendierten anorganischen Bestandteile der Ertrinkungsflüssigkeit in der Lunge und im Herzblut Ertrunkener. Diss. Düsseldorf 1941
11. H a g e n b a c h, E.: Fernere Versuche über Fluoreszenz Pogg. Ann. Jubelband 303 (1875)
12. H a i t i n g e r, M.: Die Methoden der Fluoreszenzmikroskopie in: Abderhalden, Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, S 3307 ff.

13. Hamperl, H.: Die Fluoreszenzmikroskopie menschlicher Organe. Virchow's Archiv 292:1-51 (1934)
14. Hamperl, H.: Münch. Med. Wschr. 97:1121-1125 (1955)
15. Hicks, J. D. und Matthaei, E.: Fluoreszenze Microscopy in Histology. J. Path. and Bact. 70:1-12, July 1955
16. Incze, G.: Fremdkörper im Blutkreislauf Ertrunkener. Verh. Ges. ungar. Path. 1941, 165
17. Incze, G. und Gyöngyösi, J.: Wirkung des Wasserdruckes auf die postmortale Flüssigkeitseinströmung in die Luftwege. Acta morph., Budapest, 2:349-352 (1955)
18. Incze, G. und Gyöngyösi, J.: Über Möglichkeiten des Eindringens von Flüssigkeit in die Luftwege der Wasserleichen. Kisérletes Orvostudomány 5:72-75 (1953), ref. in: Dtsch. Z. ger. Med. 42, 479
19. Incze, G. und Tamáska, L. und Gyöngyösi, J.: Zur Blutplanktonfrage beim Tod durch Ertrinken. Dtsch. Z. ger. Med. 43, 517-523 (1954/55)
20. Incze, G.: Significance of Phytoplankton resorption in death by drowning. Acta morph. 1:421-430, 1951
21. Kasparek, B.: Beiträge zur Diagnose des Ertrinkungstodes durch den Nachweis von Planktonorganismen in Lunge und Duodenum. Dtsch. Z. ger. Med. 27:132-142
22. Kasparek, B.: Die Diagnose des Ertrinkungstodes durch Nachweis spezifischer Schwebestoffe. Diss. Halle a. S. 1937
23. Lindau, D.: Kryptogamenflora, Band 4, Die Algen (1 und 2), Berlin 1926-1930
24. Mueller, B.: Zur Frage der Diagnostik des Ertrinkungstodes. Dtsch. Z. Ger. Med. 41:400-404 (1952)

25. Mueller und Gorgs, D.: Studien über das Eindringen von korpuskulären Wasserbestandteilen aus den Lungenalveolen in den Kreislauf während des Ertrinkungsvorganges. Dtsch. Z. ger. Med. 39:715-725 (1949)
26. Naeve, W.: Zur praktischen gerichtsmedizinischen Anwendung des Diatomeennachweises im großen Kreislauf. Dtsch. Z. ger. Med. 45:364-369 (1956)
27. Neves, E. und Castro, M.: L'influence du formol sur le phénomène de la fluorescence primaire des tissus, etude histo=spectrographique. C. rend. Soc. biol. 151:1473-1476 (1957)
28. Pringsheim, E. G.: Algenreinkulturen, ihre Herstellung und Erhaltung. VEB Gustav=Fischer=Verlag Jena 1954
29. Revensdorf,,: Der Nachweis der aspirierten Ertränkungsflüssigkeit als Kriterium des Todes durch Ertrinken. V. Jschr. ger. Med. III F 27, 274 (1904)
30. Rosanow, N. V.: Stockis' Methode in der Diagnose des Ertrinkens. Dtsch. Z. ger. Med. 13:473-479 (1929)
31. Sjöstrand, F.: Spontaneous fluorescence of animal tissues, with special consideration mammalian kidney. Acta anat. (Suppl. 1) 1:1-163, (1945/46)
32. Thomas, F., van Hecke, W. und Timberman, J.: Gerechtig=geneskundige Problemen bij de Verdrinkings=dood. Anatomopathologische studie. Uit de Verhandelingen van de koninklijke Vlaamse Academie voor Geneeskunde van Belgie, 1960 XXII
33. Weinig, E. und Pfanz, H.: Zur Diagnostik des Ertrinkungstodes durch den Nachweis von Diatomeen im „Optisch leeren“ Gewebsschnitt. Dtsch. Z. ger. Med. 40: 664-668 (1951)

Herrn

Professor Dr. Dr. Weinig

danke ich an dieser Stelle  
für die freundliche Überlassung des  
Themas,  
für vielfache Anregungen und  
stete Hilfe.

## Lebenslauf

Am 27. April 1935 wurde ich, Hans Wolfram Greiling, zu Rüdersdorf bei Berlin geboren als Sohn des Arztes Dr. med. Erich Greiling und seiner Ehefrau Charlotte, geb. Hartung. Nach dem Besuch der Volksschule erfolgte im Dezember 1945 Aufnahme in die Dürer-Oberrealschule Nürnberg, deren Besuch ich im Jahre 1955 mit dem Reifezeugnis abschloß. Den Krankenpflagedienst leistete ich vom 1. September bis 25. Oktober 1955 im Allgem. Städt. Krankenhaus Nürnberg. Im Wintersemester 1955/56 begann ich das Studium der Medizin an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen und bestand dort die Ärztliche Vorprüfung am 28. Februar 1958. Während des klinischen Studiums famulierte ich vom 16. September bis 25. Oktober 1958 und vom 10. Oktober bis 30. Oktober 1960 an der I. Medizinischen Klinik sowie vom 1. bis 28. April 1959 an der Psychiatrischen- und Nervenlinik der Städt. Krankenanstalten Nürnberg. Am 30. Juni 1961 beendete ich das Studium mit der Ärztlichen Prüfung in Erlangen, wo ich für die gesamte Studienzeit von 11 Semestern immatrikuliert war.

Während meiner Medizinalassistentenzeit war ich bis heute von September bis Dezember 1961 an der Psychiatrischen- und Nervenlinik, von Januar bis Juni 1962 an der I. Med. Klinik der Städt. Krankenanstalten Nürnberg tätig.





